

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**E. A. P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**Determinación de las CL50 y CL90 del hongo  
Beauveria bassiana CBLE-265 para EL control de las  
plagas Spodoptera frugiperda y Aphis craccivora**

**TESIS**

para optar al título profesional de Químico Farmacéutico

**AUTORES**

Juan Carlos Aliaga Fuentes

Joel Simeí Cruz Gutierrez

**ASESORES**

Jose Alfonso Apesteguia Infantes

Jesus Lizano Gutierrez

**Lima - Perú**

**2009**

*A Dios y María Auxiliadora, por estar a mi lado  
siempre y guiarme por el buen camino.*

*A mis padres Raúl y Marina, por brindarme  
su apoyo y dedicación incondicional en todo  
momento de mi vida.*

*A mis hermanos Raúl y Fanny por su apoyo  
incondicional en todo momento.*

*A mi esposa e hijo Nayda y Marco Antonio  
por ser los motores de mi vida.*

***Juan Carlos***

*A mis Padres Gumerindo Cruz y Sara Gutiérrez  
Por todo el apoyo, confianza, consejos y amor.*

*A mis hermanos Josias y Josmell por ser lo que  
Son : Hermanos*

*Al único y mas Grande, sin el cual nada es  
Posible, a ti JESUS el amigo y Padre por  
siempre*

***Joel***

*A nuestros asesores Mg. José Alfonso Apesteguía Infantes y Q. F. Tox. Jesús Lizano Gutierrez por sus sabios consejos y diligente dirección de nuestra tesis.*

*Al Ing. Agrónomo Whilly Soberanis por sus enseñanzas y apoyo incondicional a este trabajo.*

*Nuestro sincero agradecimiento al SENASA por habernos dado la oportunidad de realizar exitosamente este trabajo de investigación.*

*Nuestro eterno agradecimiento a los Miembros del Jurado Examinador y Calificado por su justa y pertinente labor en la asesoría y evaluación del presente trabajo de investigación:*

Dra. Augusta Córdova Rivera

Dr. Moisés García Ortiz

Dr. Manuel Torres Roca

Dr. Francisco Javier Ramírez Cruz

***Juan Carlos y Joel***

**DETERMINACIÓN DE LAS CL50 Y CL90 DEL HONGO *Beauveria bassiana*  
CBLE-265 PARA EL CONTROL DE LAS PLAGAS *Spodoptera frugiperda* Y *Aphis  
craccivora***

## ÍNDICE

### PAGINA

RESUMEN.....	1
SUMMARY .....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
HIPÓTESIS.....	4
OBJETIVOS.....	5
JUSTIFICACIÓN .....	6
I. GENERALIDADES.....	7
II. PARTE EXPERIMENTAL.....	15
III. RESULTADOS.....	21
IV. DISCUSIÓN.....	25
V. CONCLUSIONES.....	28
VI. RECOMENDACIONES.....	29
VII. ANEXOS .....	30
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	35

## RESUMEN

La plaga *Spodoptera frugiperda* (Lepidopteroa: *Noctuidae*), es una especie polífaga que se encuentra difundida en todos los países americanos, provocando grandes pérdidas en los rendimientos de varios cultivos. La plaga *Aphis craccivora* causa daños a los cultivos anuales como alfalfa, habas, alcachofa, tomate y otros, al alimentarse de la savia, provoca deformaciones en los brotes tiernos y enrollamiento de las hojas y la muerte de la planta; asimismo, secreta una mielecilla que favorece el desarrollo de especies de hongos causantes de fumagina, afectando la fotosíntesis de la planta. Dentro de las alternativas de control con bajo impacto ambiental, se realizó la investigación para evaluar la susceptibilidad de estas dos plagas a la cepa *Beauveria bassiana* CBLE-265, producida por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA), con la finalidad de determinar la concentración letal al 50 % (CL50) y la concentración letal al 90 % (CL90) de la cepa frente a la plaga *Spodoptera frugiperda* y la plaga *Aphis craccivora*. Para definir las concentraciones se tuvo como base la dosis comercial del producto. Para la inoculación se asperjaron soluciones en diferentes concentraciones de *Beauveria bassiana* CBLE-265 con atomizadores manuales, a las larvas del I, II, y III estadio de *Spodoptera frugiperda*, después se colocaron en rejillas acrílicas con dieta artificial para su evaluación, mientras que para *Aphis craccivora* se asperjaron a las ninfas que estaban en maceteros con alfalfa para su evaluación. Utilizando el programa Probit se analizaron los datos de mortalidad del bioensayo a partir del 5to día hasta que lleguen a la etapa adulta, determinándose mediante proyecciones la concentración letal media y la concentración letal noventa. Para *Spodoptera frugiperda* estadio I, el valor del CL50 fue de  $1,90 \times 10^{24}$  conidias/g y el valor del CL90 fue de  $2,30 \times 10^{31}$  conidias/g, para estadio II, el valor del CL50 fue de  $7,90 \times 10^{24}$  conidias/g y el valor del CL90 fue de  $9,10 \times 10^{31}$  conidias/g. Para el estadio III, no se encontró letalidad con la cepa estudiada. Así como para las ninfas de *Aphis craccivora* no tuvo efecto alguno la cepa estudiada, por lo que se concluye que la cepa *Beauveria bassiana* CBLE-265 no es adecuada para el control de Plaga como *Aphis Craccivora*, no teniendo un efecto significativo.

Palabras Clave: *Spodoptera frugiperda*, *Aphis craccivora*, CL50, CL90, *Beauveria bassiana* CBLE-265.

## SUMMARY

The plague *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: *Noctuidae*), is a polyphagous species that is widespread throughout in all Americans countries, causing great losses in yields of several crops. The plague *Aphis craccivora* cause damage to the annual crops as alfalfa, beans, artichoke, tomato and others, by feeding on sap, causing deformations in the buds and the leaves curl and the death of the plant; also, excreted a honeydew that encourages the development of species of fungi causing fumagin, affecting the photosynthesis of the plant. Among the control alternatives with lower environmental impact, research was conducted to evaluate the susceptibility of these two plagues at the strain *Beauveria bassiana* CBLE-265, produced by the National Service of Agrarian Health (SENASA), in order to determine the LC50 and LC90 of the strain against the plague *Spodoptera frugiperda* and the plague *Aphis craccivora*. To define the concentrations was based on the commercial dose of the product. For inoculation were sprayed solutions at different concentrations of *Beauveria bassiana* CBLE-265 with manual spray to the larva of I, II and III stage of *Spodoptera frugiperda*, then placed in acrylic racks with artificial diet for its evaluation, whereas *Aphis craccivora* were sprayed at the nymphs, were in pots with alfalfa for its evaluation. Using the Probit program were analyzed mortality data from bioassay of the 5<sup>th</sup> day until they reach the adult stage, determined through projections the median lethal concentration and lethal concentration ninety. For stage I of *Spodoptera frugiperda*, the value of LC50 was  $1,90 \times 10^{24}$  conidia/g and the value of LC90 was  $2,30 \times 10^{31}$  conidia/g, for stage II, the value of LC50 was  $7,90 \times 10^{24}$  conidia/g and the value of LC90 was  $9,10 \times 10^{31}$  conidia/g. While for the nymphs of *Aphis craccivora* had no effect of the strain studied, so it is concluded that the strain of *Beauveria bassiana* CBLE-265 is not adequate to control both plagues, not having a significant effect.

Key words: *Spodoptera frugiperda*, *Aphis craccivora*, CL50, CL90, *Beauveria bassiana* CBLE-265.



## INTRODUCCIÓN

Hoy que el Perú está inmerso en un desarrollo económico por los Tratados de Libre Comercio suscritos con mercados más exigentes, no sólo en calidad sino en los niveles de contaminación por insecticidas químicos, se presenta la necesidad urgente de una alternativa en el control de plagas.

El control biológico a través de hongos entomopatógenos, inocuos para el ser humano, se ha utilizado desde hace varias décadas para combatir plagas de importancia económica, el uso de este recurso ha ido en aumento anteponiéndose como la principal alternativa al uso de los insecticidas químicos que causan no sólo daño ambiental sino a veces produce el rechazo de productos exportados causando un perjuicio económico. Dentro de los entomopatógenos se encuentra la *Beauveria bassiana* que induce enfermedades en varios insectos-plagas hasta causarles la muerte.

Los daños más comunes en productos exportables como el tomate, maíz, lechuga, maní, etc. son causadas por dos agentes; *Aphis craccivora* y *Spodoptera frugiperda*. *Beauveria bassiana* se usa como control de plagas en productos de exportación <sup>(1)</sup>, esta eficacia se extiende a 200 especies de insectos incluyendo plagas de importancia económica <sup>(2)</sup>, dentro de ellas *Aphis craccivora* y *Spodoptera frugiperda*.

El año 2003 el Centro de Control Biológico del Servicio Nacional de Sanidad Agraria - SCB - SENASA puso en funcionamiento un laboratorio de producción masiva de hongos entre las cuales se encuentra *Beauveria bassiana* siendo la cepa comercializada la CBLE-265.

En SCB-SENASA antes del año 2006, la calidad del producto de *B. bassiana* presentaba baja concentración de esporas  $6 \times 10^9$  conidias/g, a partir del año 2006 se incrementó a  $1,40 \times 10^{10}$  conidias/g <sup>(1)</sup>.

En el presente trabajo se estudia el efecto letal de la cepa CBLE-265 sobre *Spodoptera Frugiperda* y *Aphis Craccivoray* determinar la concentración letal al 50 % (CL50) y la concentración letal al 90 % (CL90) en estas plagas.

## **HIPOTESIS**

EL hongo *Beauveria bassiana* CBLE-265 producido por SENASA tiene efecto letal sobre las plagas causadas por *Aphis Craccivora* y *Spodoptera frugiperda*.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Determinar el efecto letal de *Beauveria bassiana* CBLE-265 producido por SENASA sobre *Aphis Craccivora* y *Spodoptera frugiperda*.

### Objetivos específicos:

1. Determinar la Concentración Letal al 50 % (CL50) de *Beauveria bassiana* CBLE-265, sobre *Aphis Craccivora* y *Spodoptera frugiperda*.
2. Determinar la concentración letal al 90 % (CL90) de *Beauveria bassiana* CBLE-265, sobre *Aphis Craccivora* y *Spodoptera frugiperda*.

## JUSTIFICACIÓN

SENASA no cuenta con información de la letalidad de *Beauveria bassiana* sobre *Aphis Craccivora* y *Spodoptera frugiperda*, por lo que se requiere determinar la Concentración Letal del hongo sobre ambas plagas.

## I. GENERALIDADES

### ASPECTOS BIOLOGICOS

#### *a) Aphis craccivora*

Los pulgones son insectos pequeños que miden hasta 4 mm de longitud. Generalmente, existen adultos alados y ápteros en la misma especie, con tendencia a formar colonias sobre la planta infestada. Se reconocen por su cuerpo globoso, piriforme, frágil y su característica posición casi inmóvil en las hojas de sus hospederos, con el aparato picador chupador inserto siempre en el tejido vegetal.<sup>(3)</sup>

Estos insectos presentan unas estructuras exclusivas en el abdomen, que permiten identificar las especies de pulgones, ellos son la cauda, que se ubica en la parte distal del abdomen, y los sifones o cornículos, entre el quinto y sexto segmento abdominal dorsal. Son estructuras tubulares de largo, color y forma variable.<sup>(3)</sup>

Taxonomía:

Orden: *Homóptera*

Familia: *Aphididae*

Nombre científico: *Aphis craccivora*

Nombre común: Pulgón negro de las leguminosas

El pulgón negro de la alfalfa (*Aphis craccivora*) mide de 1,5 a 2,2 mm de largo. Las formas aladas son de color negro brillante con ojos rojos oscuro. Las antenas no alcanzan a los dos tercios del largo del cuerpo. El extremo de las tibias, la cauda y los cornículos son negros. Las hembras son de color negro ligeramente verdosas. Se encuentran en 2 estadios: Ninfa y adulto.<sup>(3)</sup>

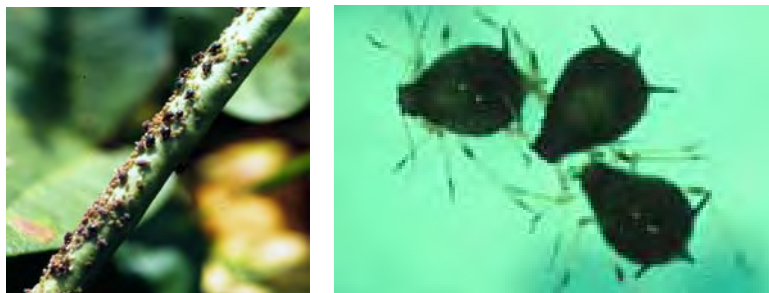


Figura 01. Ninfas y adultos de *Aphis craccivora*.

### **Ninfa**

*Ninfa recién nacida:* Posee una coloración marrón oscura o gris oscura. Al nacer se alimenta succionando con su estilete la savia de las hojas.

*Ninfa áptera:* En los sucesivos estados ninfales por los que pasa, se caracteriza por estar recubierta por un polvillo céreo. Son más largas que los adultos, dado que tienen el abdomen menos ensanchado que éstos.

*Ninfa alada:* La morfología y color son similares al resto de ninfas, diferenciándose de éstas en que van apareciendo los muñones alares.

### **Adulto**

*Adulta áptera:* Es de color negro y posee una placa también negra en su dorso que la caracteriza y le da brillantez. Tiene los sifones largos y las patas son amarillentas con zonas oscurecidas. Su tamaño oscila entre 1,4 y 2,0 mm.

*Adulta alada:* Es de color negro, diferenciándose de la áptera por la presencia de alas y por la menor longitud de los sifones.

Cuadro 01. Efecto de temperatura en la biología de *Aphis craccivora*.

Temperatura (°C)	Días	Temperatura umbral (5°C)
10	25	Sobrevive bajo 15°C Limita su desarrollo sobre 30°C
20	9	Produce 80 pulgones/hembra Hembra dura 25 días
25	7	Temperatura para volar sobre 15°C y menores de 30 °C.

Referencia: Propia

## **b) *Spodoptera frugiperda*.**

Taxonomía:

Orden: Lepidoptera

Familia: Noctuidae

Genero: *Spodoptera*

Especie: *frugiperda*

Nombre común: cogollero del maíz

*Spodoptera frugiperda* constituye la plaga más importante del cultivo del maíz en el Perú y en diferentes países de la región Neotropical, las pérdidas que esta ocasiona son cuantiosas, pudiendo reducir los rendimientos en 0,8 t/ha de maíz seco. Las larvas consumen principalmente las hojas que indirectamente afectan el rendimiento del cultivo, reduciendo el área fotosintética de estas; el ataque a plantas pequeñas, daña o destruye el tejido meristemático, ocasionando reducción de la población de plantas o modificación de su estructura. <sup>(4)</sup>

En estudios cuantitativos sobre la selectividad de la plaga contra la planta de maíz, se ha demostrado el daño en etapa de crecimiento a las 5, 8 y 13 hojas, las pérdidas son de 26,26 y 20 % respectivamente; cuando el ataque se produce en etapas más tempranas el daño puede ser mayor, ya que las plantas no pueden recuperarse. <sup>(4)</sup>

### **Características biológicas.**

La mariposa vuela con facilidad durante la noche, siendo atraída por la luz; es de coloración gris oscura algo maculada, las hembras tienen alas traseras de color blancuzco, mientras que los machos tienen arabezcillos llamativos en las alas delanteras, y las traseras son blancas.

Las hembras depositan los huevos corrientemente durante las primeras horas de la noche, tanto en el haz como en el envés de las hojas, estos son puestos en varios grupos o masas cubiertas por segregaciones del aparato bucal y escamas de su cuerpo. Una hembra puede poner como promedio 1000 huevecillos en grupos de 10 a 350 en cada puesta, las larvas nacen a los tres días o menos, cuando la temperatura es elevada (> 25° C).

Las larvas al nacer se alimentan del coreón, más tarde se trasladan a diferentes partes de la planta o a las vecinas, evitando así la competencia por el alimento y el canibalismo, su color varía según el alimento pero en general son oscuras con tres rayas pálidas estrechas y longitudinales; en el dorso se distingue una banda negruzca más ancha hacia el costado y otra parecida pero amarillenta más abajo, en la frente de la cabeza se distingue una "Y" blanca invertida.

Las larvas pasan por 6 ó 7 estadíos, siendo de mayor importancia para tomar las medidas de lucha los dos primeros; en el primero estas miden hasta 2 - 3 mm y la cabeza es negra completamente, el segundo mide de 4 - 10 mm y la cabeza es carmelita claro; las larvas pueden alcanzar hasta 35 mm en su último estadío. A partir del tercer estadío se introducen en el cogollo, haciendo perforaciones que son apreciados cuando la hoja se desvaina.

Las pupas son de color caoba y miden 26 mm; esta fase se desarrolla en el suelo y el insecto está en reposo hasta 8 - 10 días que emerge el adulto.

En ensayos de selectividad, realizados en condiciones de laboratorio, se encontró que con Napier se presenta un mayor porcentaje de mortalidad, con frijol de terciopelo las pupas tuvieron más peso y con maíz el ciclo biológico fue más corto, mientras con sorgo el porcentaje de machos aumentó.

El período de tiempo para el desarrollo larval es menor a medida que aumentan las temperaturas, con 22 y 13 días a 20 y 30 °C, respectivamente; a temperatura ambiente (media = 26,50 °C) este es de 15 + 5 días con la particularidad de que se presentaron 7 estadíos.

El período de oviposición de los adultos a 30 °C es de 4 días y 3 días para las restantes temperaturas; a temperatura ambiente los adultos duraron 12 días.

El ciclo de vida oscila entre 19 y 48 días y está en correspondencia con la dependencia de la temperatura de las distintas fases; a temperaturas elevadas el ciclo se acorta a temperatura de 26,50 °C las hembras ponen 1216 huevos, a 25 °C 944 y a 30 °C se reduce a 386.



Los valores del límite inferior de temperatura oscilan entre 10,30 y 14,60 °C, para las distintas fases del ciclo biológico. Según los estudios realizados la plaga puede tener entre 11 y 12 generaciones anuales.

**c) *Beauveria bassiana*.**

*B. bassiana* es un hongo entomopatógeno que se encuentra en la naturaleza en rastros de los cultivos, estiércol, y en suelo en plantas <sup>(5)</sup>. Este hongo causa enfermedades en los insectos plagas hasta causar la muerte, el cual se ha encontrado atacando a más de 200 especies de insectos de diferentes órdenes <sup>(2)</sup>. Entre las plagas controladas por este hongo esta la broca del café, plutella del repollo, picudo del plátano, cogollero del maíz, etc. <sup>(2, 6, 7, 8)</sup>. Los insectos muertos por *B. bassiana* presentan una cubierta blanca algodonosa sobre el cuerpo, la cual está formada por el micelio y esporas del hongo <sup>(2)</sup>. En el Perú este hongo esta siendo utilizado para el control de plagas en los cultivos de exportación <sup>(1)</sup>.

Los estudios toxicológicos de la cepa de *B. bassiana* GHA realizados por EPA de los Estados Unidos, señala que no causa daño a los animales <sup>(9)</sup>.

**Características de la pared celular de los hongos entomopatógenos**

La pared celular de los hongos está constituida por polisacáridos (80 %), proteínas (3 – 20 %), lípidos, pigmentos y sales inorgánicas en cantidades menores. La quitina forma microfibrillas y es el polisacárido característico de la pared celular en hongos, pero también existe en los insectos. Este polímero es un polisacárido no ramificado, constituido de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), donde los monómeros están unidos por enlaces b-1,4 y existen tres tipos de quitina: a, b y g.

Las proteínas son glicoproteínas, cuya fracción glicosilada esta formada por galactosa y manosa. Los lípidos en la pared celular de los hongos están presentes en un rango de 1 a 10 % de su peso seco; son ácidos grasos, siendo los más abundantes C16 y C18. La coloración característica de la pared celular se debe a la presencia de melaninas, producto de la oxidación de diferentes fenoles. La importancia de estos pigmentos se debe a su carácter protector ante efectos deletéreos ocasionados por la luz o por las enzimas líticas <sup>(10)</sup>.

En la pared celular ocurren cambios durante las diferentes etapas de desarrollo de los hongos, cambios que ocurren mediante el ensamblaje de los componentes celulares como polisacáridos microfibrilares, la asociación de polisacáridos de reforzamiento y de complejos de proteínas (glicoproteínas). Las glicoproteínas inician su ensamblaje a nivel del lumen, en el interior del retículo endoplásmico rugoso; posteriormente, son transportadas a diferentes compartimientos membranosos del retículo endoplásmico liso y del aparato de Golgi, hasta alcanzar la superficie celular mediante el aparato vesicular. Este conglomerado vesicular conduce a las glicoproteínas y otros componentes hacia la pared celular pasando por la membrana plasmática; los otros componentes siguen esta vía para integrarse a la pared celular, tanto para la formación de la espora, como del desarrollo de micelio <sup>(10; 11)</sup>.

### **Mecanismo patogénico.**

Los hongos entomopatógenos inician su proceso infectivo en los insectos hospederos cuando las esporas viables son retenidas por contacto en la superficie del integumento, mientras encuentran un espacio propicio para establecer la asociación patógeno-hospedero <sup>(12)</sup> y formar los túbulos germinales y a veces el apresorio, que facilitarán la invasión del hongo <sup>(13; 14; 15; 16, 17)</sup>.

Se ha sugerido que iones divalentes como el  $\text{Ca}^{+2}$  y el  $\text{Mg}^{+2}$  reducen las fuerzas de repulsión electrostática de la superficie de la del insecto, por lo que pueden afectar su hidrofobicidad y promover la adhesión pared celular fúngica-cutícula (Figura 2a), creando condiciones favorables para el establecimiento de la espora y la subsecuente invasión del hospedero <sup>(18; 19)</sup>.

La germinación de la espora se inicia con el hinchamiento de la misma, que es favorecido por una humedad alta (70 % durante 14 horas); la germinación es disparada por mensajeros que generalmente son carbohidratos presentes en las proteínas cuticulares del insecto <sup>(20)</sup>. La hidratación de la espora es favorecida por la acción antidesecante de su cubierta mucilaginosa, que además funciona como protector ante la presencia de polifenoles tóxicos y enzimas, secretadas por sistema inmune del insecto. *Metarhizium anisopliae* presenta un alto contenido de aminopeptidasas e hidrofobina, las cuales favorecen la acción de enzimas extracelulares sobre la cutícula del insecto. Sin embargo, se han encontrado esterasas y proteasas en conidias no germinadas, lo que sugiere una modificación de la superficie

cuticular previa a la germinación, ya que durante la hidratación la espora no solo absorbe agua, sino también nutrientes <sup>(21; 22)</sup>. Los lípidos que se encuentran en la cutícula de la mosquita blanca pueden afectar potencialmente la germinación de la espora como resultado de su acción fungilítica o fungiestática, o actuando como una barrera en la matriz de quitina del exoesqueleto del insecto, previniendo que la espora entre en contacto con los nutrimentos y se inicie la señal de disparo de la germinación <sup>(23)</sup>.

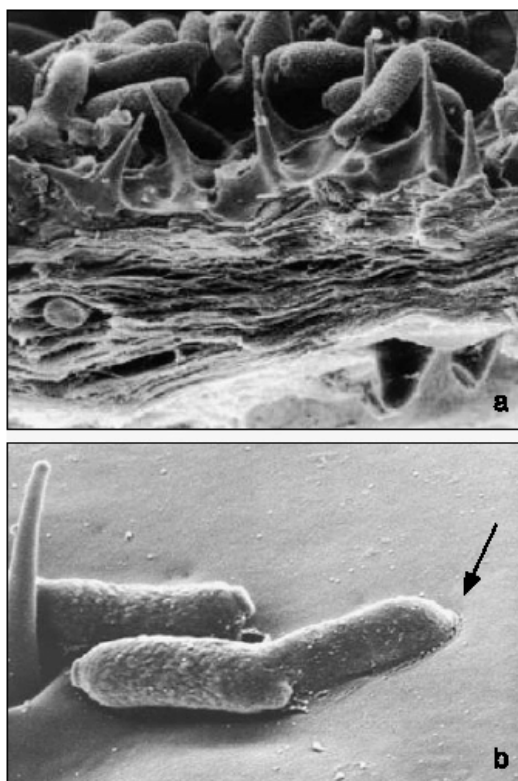


Figura 02. a: Conidias sobre la cutícula de un insecto, b: formación de apresorio.

Después del hinchamiento de la espora tiene lugar la formación del tubo germinativo mediante el proceso de polarización típico del crecimiento apical de los hongos, que estimula la síntesis de la pared celular. Los iones  $H^+$  y  $Ca^{2+}$  entran en la punta de la hifa a través de un mecanismo de transporte pasivo y son expulsados por mecanismos dependientes de energía. Este flujo transcelular permanece constante y mantiene el desarrollo del tubo germinativo y la formación del apresorio (Figura 2b), una estructura especializada formada en el tubo germinativo <sup>(11; 24)</sup>. El tubo germinativo rastrea y reconoce la superficie del insecto para la localización de sitios receptores, habilitando a la hifa para la penetración de la cutícula. El apresorio sirve para el anclaje de la espora y ejerce una presión hacia el interior del insecto. Paralelamente, el hongo excreta una gran cantidad de

enzimas entre las que se incluyen proteasas, quitinasas, quitobiasas, lipasas, lipooxigenasas y otras enzimas hidrolíticas, que van degradando la cutícula y proporcionan a su vez nutrientes al hongo <sup>(5)</sup>.

Una vez dentro del insecto, el hongo prolifera formando cuerpos hifales secundarios, que se ramifican en la procutícula conformada principalmente de fibrillas lameladas de quitina embebidas en una matriz proteínica que actúa como cubierta física protectora ante las secreciones extracelulares del patógeno. Posteriormente, los cuerpos hifales se encuentran con la capa epidérmica y con su respectiva membrana basal y se diseminan a través del hemocele <sup>(14)</sup>. Así, invaden diversas estructuras como tejidos musculares, cuerpos grasos, tubos de Malpighi, mitocondrias, hemocitos, retículo endoplásmico y membrana nuclear.

Al agotarse los nutrientes, el hongo inicia un crecimiento miceliar invadiendo todos los órganos del hospedero. Finalmente, las hifas penetran la cutícula desde el interior del insecto y emergen a la superficie iniciando la formación de esporas cuando la humedad relativa es adecuada <sup>(25)</sup>.

Cabe destacar que durante la penetración del hongo desde la cutícula del insecto hasta el hemocele, la hifa queda inmersa en proteínas, quitina, lípidos, melanina, difenoles y carbohidratos; algunos de ellos son nutrimentos pero otros pueden inhibir su crecimiento, ya que el insecto activa su sistema inmune a través de procesos como la melanización, fagocitosis, nodulación y encapsulamiento <sup>(26)</sup>. Sin embargo, los hongos desarrollan una serie de actividades que les permiten evitar este tipo de defensas, tales como cambios en la pared celular y producción de sustancias inmunomodulatorias o toxinas fúngicas <sup>(27)</sup>.

Se ha reportado la producción de ácido oxálico por *Beauveria* spp., *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *Metarhizium anisopliae* <sup>(16; 20)</sup>. Este compuesto ha sido descrito como un factor de virulencia en hongos fitopatógenos y se ha sugerido que en el caso de los hongos entomopatógenos puede ser un elemento que coadyuve a la solubilización de la proteína cuticular <sup>(27)</sup>. También se han reportado toxinas peptídicas cíclicas y lineales. A las primeras pertenece una familia de péptidos conocidos como depsi péptidos. El primer compuesto de esta naturaleza en ser caracterizado fue la beauvericina, extraída del micelio de *Beauveria bassiana* <sup>(28)</sup>. Otro metabolito aislado de *B. bassiana* y *L. (V.) lecanii*, conocido como basianólido, mostró una fuerte acción insecticida tanto por ingestión como por inyección contra larvas de gusanos <sup>(29)</sup>.

## **II. PARTE EXPERIMENTAL**

### **2.1 Localización**

La investigación se realizó entre los meses de Noviembre 2007 a abril 2008 en el Laboratorio del Centro Control Biológico del Servicio Nacional de Sanidad Agraria Ate, Vitarte.

### **2.2 Cría de *Spodoptera frugiperda* y *Aphis Craccivora***

La crianza de *Spodoptera frugiperda*, se alimenta con una dieta artificial.

Las masas de huevos se colocaron un vasito de plástico con hojas de higuerilla y un trozo de dieta artificial, el cual se encuentra a una temperatura de 26 °C. Las larvas de los huevos que eclosionaron a los cuatro días se colocaron en rejillas individuales con dieta y se dejaron crecer hasta cumplir los estadíos para ser utilizadas en los bioensayos.

Para *Aphis Craccivora* se usaron las plantas de Alfalfa en terrenos de SENASA. Dejando El Ciclo de vida Natural en los estadios primarios hasta su concepción como PULGON.

### **2.3 Dieta artificial.**

Las larvas de *Spodoptera frugiperda* fueron alimentadas con dieta artificial, la cual se elaboró de acuerdo al siguiente procedimiento: se hirvieron 6 L de agua destilada y luego se agregaron los granos de frijol. Se mantuvo por espacio de 45 minutos hasta que perdieron su dureza, después se escurrió el agua.

Se licuó el frijol, el germen de trigo, la levadura de cerveza y el agar agar con toda el agua destilada del anterior proceso. (6L)

Se autoclavó por una hora a 15 libras de presión.

Se dejó enfriar por aproximadamente una hora y media dentro de la bolsa (pero que aún este líquido).

Por un lado de la bolsa se introdujo los otros ingredientes y se agitó bien como para que se mezclara en forma uniforme, al final se agregó la solución inhibidora compuesta por Ácido Propiónico 20 mL, Ácido Fosfórico 2,10 mL y agua destilada 27 mL.

Cuadro 02. Proporción de los ingredientes de la dieta artificial para *Spodoptera frugiperda*, CCB-SENASA.

Ingredientes	Proporciones			
Frijol (g)	200,00	400,00	500,00	800,00
Germen de trigo (g)	79,20	158,40	198,00	316,80
Levadura de cerveza (g)	50,60	101,20	126,50	202,40
Acido sórbico	1,64	3,28	4,10	6,56
Acido ascórbico (mL)	5,00	10,00	12,50	20,00
Nipagyn (mL)	3,16	6,32	7,90	12,64
Agar agar (g)	22,00	44,00	55,00	88,00
Formol 37,00 % (mL)	5,00	10,00	12,50	20,00
Solución inhibidora (mL)	5,00	10,00	12,50	20,00
Agua destilada (L)	1,17	2,34	2,93	4,68

Referencia: Propia

## 2.4 Muestra Biológica

El producto de *Bauveria bassiana* CBLE-265, cepa aislada de *Hypothenemus hampei* “Broca del café” fue producida comercialmente por la SCB-SENASA, se obtuvieron tres lotes de producción los cuales fueron analizados y procesados en el laboratorio de SCB-SENASA.

## 2.5 Control de calidad

Se determinaron la concentración, viabilidad, pureza.

### 2.5.1 Concentración.

Fundamento:

Permite conocer el número de conidias en 1 gramo de arroz de hongo *B. bassiana*.

Procedimiento:

De cada lote de producción del hongo *Bauveria bassiana*, se tomaron pequeñas muestras en frasquitos de baquelita, hasta 1 g del producto y se colocaron en 10 mL de agua destilada estéril con 0,10 % de Tween 80 y se denominaron suspensión inicial o tubo inicial (suspensión de 1 g del producto en 10 mL = volumen inicial =  $10^0$ ).

Se agitó en un vortex por 1 minuto.

Se realizaron diluciones tomando 1 mL del tubo inicial y colocar en otro tubo conteniendo 9 mL de agua ( $10^{-1}$ ), se continuó el procedimiento hasta obtener una dilución de ( $10^{-3}$ ).

De la dilución  $10^{-3}$ , con la ayuda de una pipeta Pasteur, se llenó la cámara de Neubauer con la suspensión de conidias y se cubrió con un cubre-objetos.

Luego con la ayuda de un microscopio con el objetivo 40X contabilizar el número de conidias del hongo benéfico en cada recámara y anotar; repetir el conteo como mínimo 2 veces.

Para estandarizar la metodología, se contó 4 veces por muestra y se anotó los datos. Para determinar la concentración del número de conidias se utilizó la siguiente fórmula:

Concentración conidias (mL) del tubo inicial =  $X * \text{Factor} / 5 * \text{ID}$  ..... (i)

Concentración conidias (g) del tubo inicial =  $X * \text{Factor} / 5 * \text{ID} * \text{ViPm}$  .... (ii)

Donde:

X = Promedio de conidias contadas

Factor =  $5 \times 10^{-4}$

5 = N° cuadraditos contados en el cuadrante central “E”

ID = Inversa de la dilución empleada (mL)

Vi = Volumen inicial (10 mL agua)

Pm = Peso de la muestra (1 gramo del producto)

### **2.5.2 Viabilidad.**

Fundamento:

Permite conocer el porcentaje de esporas vivas de hongo *Bauveria bassiana* en 1 g de arroz.

Procedimiento:

Para medir la viabilidad de las esporas de *B. bassiana*, se colocó 1 g de las esporas en tubos conteniendo 10 mL de agua destilada estéril con 0,10 % de Tween 80, luego realizar

diluciones hasta  $10^{-3}$ , y se dejaron hidratar por 6 horas. En una placa petri conteniendo el medio PDA se colocó 1  $\mu$ L de la dilución, con un asa de Hólen extendiendo por toda la placa. Después de 18 horas de incubación, se adicionó a la placa una gota de azul de lactofenol en tres puntos distintos, seguidamente se colocó un cubre objetos en cada punto, luego con la ayuda de un microscopio (40x ocular) y un contómetro se contabilizó las esporas germinadas y no germinadas, se contó como mínimo 100 conidias por cada punto de la placa.

El porcentaje de germinación se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Germinación de esporas} = \frac{g}{G + ng} \times 100$$

$g$  = número de conidias germinadas

$ng$  = número de conidias no germinadas

### 2.5.3 Pureza.

Fundamento:

Permite conocer si el producto final es puro o tiene contaminantes en 1 g de arroz de hongo *B. bassiana*.

Procedimiento:

Se pesó 1 g del producto final, y se colocó en un tubo conteniendo 10 mL de agua destilada estéril más 0,10 % de Tween 80, se agitó en un vortex por un minuto, luego se tomó 1 mL y se puso a un tubo que contenga 9 mL de agua destilada estéril más 0,10 % de Tween 80, se realizó este proceso hasta obtener una dilución de  $10^{-9}$ , luego se tomó 200  $\mu$ L de cada dilución y se sembró en placas petri conteniendo medio PDA, con un asa de Hólen se homogenizó la solución por toda la placa, para cada dilución se preparó 3 placas. Se incubó a temperatura de  $25 \pm 2$  °C por espacio de 3 a 5 días, luego de los cuales se observaron y registraron los datos, comenzando con el conteo del número de colonias presentes en la placa con la dilución  $10^{-9}$  y se estimó el porcentaje del hongo *B. bassiana*, bacterias y levaduras, presentes mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Pureza} = \frac{\text{UFC he}}{\text{UFC t}} \times 100$$



UFC he = Unidades formadoras de colonias del hongo evaluado  
UFC t = Unidades formadoras de colonias totales

## **2.6 Bioensayo de línea de base - Patogenicidad.**

Fundamento:

Permite conocer la agresividad de causar muerte en corto tiempo al insecto a la dosis comercial del producto final.

Procedimiento:

Las esporas del hongo *B. bassiana* CBLE-265, fueron hidratadas por 18 horas luego se aplicaron sobre larvas de 1er, 2do y 3er estadio de *Spodoptera frugiperda*, las cuales fueron colocadas individualmente en vasos descartables con alimento de dieta a base de frijol, se agruparon los vasos en grupos de 40 individuos, obteniéndose 3 grupos de 40 individuos cada grupo, cada vaso fue una unidad experimental y cada grupo fue una repetición.

Así como la aplicación sobre ninfas y adultos de *Aphis craccivora*, que fueron alimentadas con plantas de alfalfa colocados en jaulas. Así mismo dentro de la jaula se colocó 3 maceteros conteniendo 40 pulgones en cada macetero con plantas de alfalfa. Cada macetero fue una unidad experimental y cada jaula fue una repetición.

Se utilizó una concentración de  $7,00 \times 10^9$  conidias/g y luego se asperjaron con atomizadores manuales a las dos plagas en estudio.

### **2.6.1 Determinación de la concentración letal al 50 % (CL50) y concentración letal al 90 % (CL90).**

Para determinar la dosis necesaria para matar el 50 % y 90 % de la población larval de *Spodoptera frugiperda* (CL50 y CL90), se evaluaron seis concentraciones de la solución conidial ( $1,00 \times 10^{12}$ ;  $1,50 \times 10^{11}$ ;  $1,00 \times 10^{11}$ ;  $1,00 \times 10^{10}$ ;  $1,00 \times 10^9$ ;  $1,00 \times 10^8$  conidias/mL) y un testigo (sin tratamiento). Para cada tratamiento se utilizó 60 larvas del primer, segundo y tercer estadio larval, agrupadas en 3 grupos de 20 larvas colocadas individualmente en 20 vasos con dieta a base de frijol.

La evaluación se realizó diariamente durante 7 días, registrándose la mortalidad diaria.

Utilizando la misma cepa de *B. bassiana*, se determinó la dosis necesaria para matar el 50 % y 90 % de la población de ninfas y adultos de *Aphis craccivora* (CL50 y CL90), se evaluó seis concentraciones de la solución conidial ( $1,00 \times 10^{12}$ ;  $1,50 \times 10^{11}$ ;  $1,00 \times 10^{11}$ ;  $1,00 \times 10^{10}$ ,  $1,00 \times 10^9$ ;  $1,00 \times 10^8$  conidias/mL) y un testigo (sin tratamiento). Para cada tratamiento se utilizó 60 individuos de ninfas de pulgón, agrupadas en 3 grupos de 60 pulgones colocados sobre maceteros con planta de habas de las cuales se alimentaron, cada macetero fue una unidad experimental y cada jaula fue una repetición. La evaluación se realizó diariamente durante 7 días, registrándose la mortalidad diaria.

Las larvas y ninfas muertas se *Spodoptera frugiperda* y *Aphis craccivora* respectivamente fueron colocadas en cámaras húmedas para observar el crecimiento del micelio y se verificó la muerte si fue por el hongo aplicado (*B. bassiana*).

El diseño fue completado al azar, se realizó un análisis de varianza al porcentaje de mortalidad total y micosis, los cuales fueron transformados previamente al  $\arcsen(x)^{1/2}$ , los promedios se compararon mediante el análisis Waller y Duncan ( $p < 0.05$ ). Con los datos de mortalidad diaria se determinaron el TL50 y sus límites de confianza, mediante el análisis de Probit. Los datos de mortalidad acumulada de cada concentración fueron corregidos mediante la fórmula de Abbott, determinándose la CL50 y la CL90 y sus límites de confianza respectivos mediante el análisis de Probit.

#### **2.6.2 Determinación del tiempo letal medio (TL50) de las (CL50) y CL90).**

Este parámetro nos permitió calcular el tiempo necesario para matar el 50 % de la población larval de *Spodoptera frugiperda* y ninfas de *Aphis craccivora* con la CL50 y la CL90 del hongo *B. bassiana*. La metodología fue similar al anterior ensayo. Para cada tratamiento se utilizó 360 larvas de *Spodoptera frugiperda* agrupadas en 3 grupos o repeticiones de 20 larvas individualizadas en vasos descartables. Así mismo, se utilizó 60 individuos ninfas del pulgón, agrupadas en 3 grupos de 60 pulgones colocados sobre maceteros con planta de habas, cada macetero fue una unidad experimental y cada jaula fue una repetición. Cada uno de ellos fue evaluado por 12 a 15 días registrándose la mortalidad. Mediante la prueba de proporciones Z se comparó el porcentaje de mortalidad. Con los datos acumulados diariamente se determinaron el TL50 para cada CL50 y CL90; y sus respectivos límites de confianza mediante el análisis de Probit.

### III. RESULTADOS

#### 3.1 Tamaño de muestra.

Se tomaron tres lotes de producción en distintos periodos del ensayo un aproximado 500 g cada vez del producto final de *Bauveria bassiana* CBLE-265 cepa aislado de *Hypothenemus hampei* “Broca del café”, Lote (Diciembre 2007), Lote (Enero 2008) y Lote (Marzo 2008).

#### 3.2 Control de calidad.

Cuadro 03. Porcentaje de viabilidad y pureza de lotes de *B. bassiana* CBLE-265

Cepa comercial de <i>Beauveria bassiana</i>	Concentración (conidias/g de arroz)	Porcentaje de Viabilidad (%)	Porcentaje de pureza (%)
Lote (Diciembre 2007) <i>B. bassiana</i> CBLE - 265	2,01 x 10 <sup>10</sup>	100	100
Lote (Enero 2008) <i>B. bassiana</i> CBLE - 265	2,05 x 10 <sup>10</sup>	100	100
Lote (Marzo 2008) <i>B. bassiana</i> CBLE - 265	2,02 x 10 <sup>10</sup>	100	100
Referencia: Propia			

#### 3.3 Patogenicidad y virulencia.

Cuadro 04. Determinación de la frecuencia y porcentaje de patogenicidad y virulencia de *B. bassiana* sobre *S. frugiperda*

Concentración (conidias/g)	Estadío 1		Estadío 2		Estadío 3	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
7x10 <sup>9</sup>	0	0	0	0	0	0
Referencia: Propia						

### 3.3.1 Concentración Letal al 50 % (CL50) y Concentración Letal al 90 % (CL90) de *B. bassiana* CBLE-265

**Cuadro 05. Valores estimados de las concentraciones del estadio 1 y 2 según análisis probit**

<b>Concentración letal</b>	<b>Estadio</b>	
	<b>Estadio 1</b>	<b>Estadio 2</b>
<b>CL50</b>	1,90 x 10 <sup>24</sup> (1,01 x 10 <sup>19</sup> ; 3,50 x 10 <sup>51</sup> )	7,90 x 10 <sup>24</sup> (2,30 x 10 <sup>19</sup> ; 2,40 x 10 <sup>53</sup> )
<b>CL90</b>	2,30 x 10 <sup>31</sup> (1,70 x 10 <sup>23</sup> ; 1,90 x 10 <sup>73</sup> )	9,10 x 10 <sup>31</sup> (3,80 x 10 <sup>23</sup> ; 1,30 x 10 <sup>75</sup> )

Referencia: Propia

Los datos de mortalidad de las larvas del bioensayo, colectados fueron analizados en el programa Probit <sup>(30)</sup>.

**Cuadro 06. Mortalidad de larvas de *Spodoptera frugiperda* por nivel de concentración según los estadios.**

<b>Concentración conidias/g</b>	<b>Estadio 1</b>		<b>Estadio 2</b>		<b>Estadio 3</b>	
	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
		(%)		(%)		(%)
<b>1,00 x 10<sup>12</sup></b>	31 de 72	43,06	25 de 72	34,72	0 de 72	0,00
<b>1,50 x 10<sup>11</sup></b>	26 de 72	36,11	19 de 72	26,40	0 de 72	0,00
<b>1,00 x 10<sup>11</sup></b>	20 de 72	27,78	14 de 72	19,40	0 de 72	0,00
<b>1,00 x 10<sup>10</sup></b>	12 de 72	16,67	8 de 72	11,10	0 de 72	0,00
<b>1,00 x 10<sup>9</sup></b>	0 de 72	0,00	0 de 72	0,00	0 de 72	0,00
<b>Testigo</b>	0 de 72	0,00	0 de 72	0,00	0 de 72	0,00
<b>Total : 72 casos por concentración</b>						

Referencia: Propia

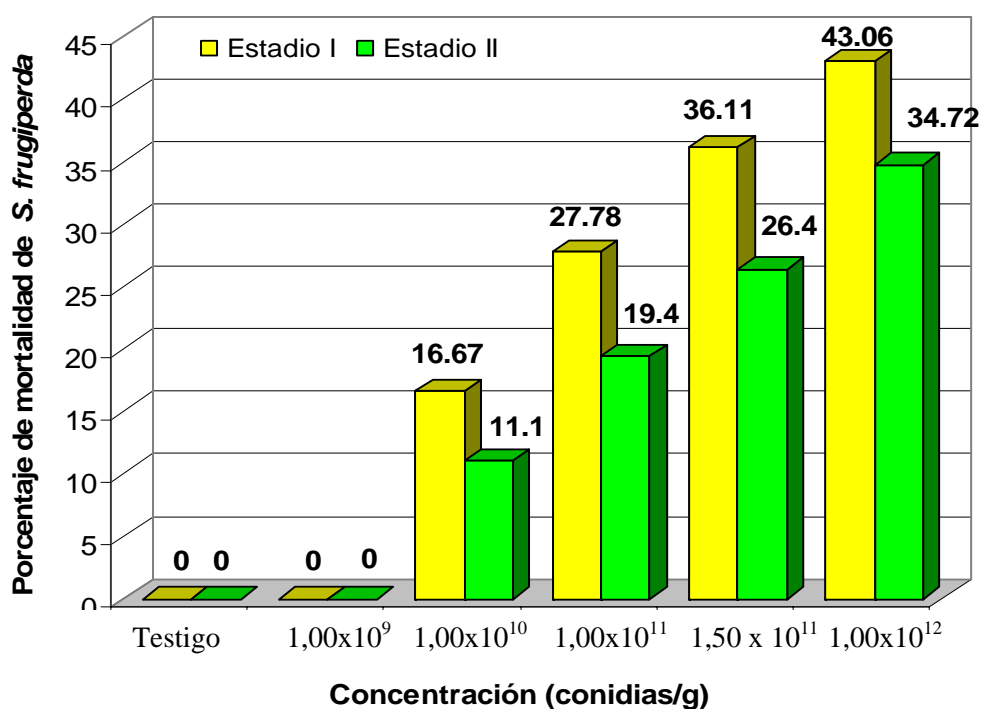


Figura 03. Porcentaje de muerte de *Spodoptera frugiperda* por efecto de *B. bassiana*.

### 3.3.2 Determinación del tiempo letal medio (TL50) de las (CL50) y (CL90) del hongo *B. bassiana* CBLE-265.

Cuadro 07. Tiempo de mortalidad de la población de *S. frugiperda* afectada por *B. bassiana*

Concentración conidias/g	Valores de tiempo de muerte promedio de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Días)			
	50 %		90 %	
	Estadio 1	Estadio 2	Estadio 1	Estadio 2
1,00 x 10 <sup>10</sup>	15,90 (12,50 ; 20,80)	16,50 (13,14 ; 21,11)	20,80 (15,94 ; 29,55)	20,40 (16,62 ; 29,81)
1,00 x 10 <sup>11</sup>	15,20 (14,62 ; 20,49)	17,01 (14,44 ; 20,28)	22,10 (19,06 ; 31,66)	22,90 (18,87 ; 32,46)
1,50 x 10 <sup>11</sup>	16,80 (14,26 ; 20,68)	16,70 (14,89 ; 23,99)	22,90 (18,61 ; 30,66)	23,70 (19,24 ; 32,96)
1,00 x 10 <sup>12</sup>	17,30 (16,59 ; 20,67)	21,70 (15,98 ; 29,07)	21,50 (19,52 ; 31,46)	25,90 (24,915 ; 35,86)

Referencia: Propia

**Cuadro 08. Estudio del efecto de *B. bassiana* CBLE-265 sobre *Aphis craccivora*.**

<b>Concentración Conidias/g</b>	<b>N° pulgones</b>	<b>N° Macetas</b>	<b>N° ninfas enfermas/6-9 días</b>
<b>1,00 x 10<sup>11</sup></b>	164	3	0
<b>1,00 x 10<sup>10</sup></b>	163	3	0
<b>1,00 x 10<sup>9</sup></b>	163	3	0
<b>Testigo</b>	165	3	0

Referencia: Propia

#### IV. DISCUSIÓN

Las muestras analizadas de los distintos lotes de producción de la cepa de *B. bassiana* CBLE-265 del laboratorio de hongos entomopatógenos de la SCB-SENASA, estuvieron disponibles y fueron representativas para ejecutar la investigación.

Según el Cuadro 03, el control de calidad de cada lote de la cepa utilizada indicaron que los porcentajes de viabilidad y de pureza fue de 100 % con una concentración de  $2,00 \times 10^{10}$  conidias/g., esto garantizó que el producto utilizado presentó en control de calidad adecuado, demostrando no presentar inconvenientes para ser analizadas frente a la plaga. El análisis de control de calidad de los lotes de producción del hongo entomopatógeno fue estable en las distintas fechas de producción. Así mismo, en los tratamientos testigo no se observó mortalidad por los hongos, por lo tanto no fue necesario corregir los valores de mortalidad de los tratamientos con la cepa estudiada.

Según el Cuadro 04, a la dosis de  $7,00 \times 10^9$  conidias/gramo, concentración recomendada de *B. bassiana* para el control de insectos plaga, no tuvo ningún efecto sobre los primeros estadíos larvales de *S. frugiperda*, cabe indicar los primeros estadíos larvales son los estadíos mas susceptibles para su control ya sea con producto biológico con *Bacillus thuringiensis* ó un insecticida químico. Por lo que la cepa no es adecuada para la plaga *S. frugiperda*. Sin embargo cepas de *B. bassiana* (BAZAM®) para *S. frugiperda* lograron una mortalidad de 90 % con la concentración de  $7,00 \times 10^8$  conidias/g<sup>(31)</sup>, esto se debe a que la cepa utilizado es mas patogénica y virulenta a *S. frugiperda*, con menor unidades formadores de colonia tuvo una mayor mortalidad que los resultados obtenidos por<sup>(32)</sup>. El sustrato o insecto en el cual se reactiva el hongo entomopatógeno influye mucho en la virulencia hacia la plaga<sup>(33)</sup>; cabe mencionar que la cepa *B. bassiana* CBLE-265 no fue reactivada en *S. frugiperda*; mientras que la cepa de *B. bassiana* (BAZAM®) fue reactivada para *S. frugiperda*<sup>(8)</sup>.

Según el Cuadro 05, los datos de mortalidad de las larvas del bioensayo, colectados fueron analizados en el programa Probit<sup>(30)</sup>, y fueron encontrados los valores para cada estadío larval.

Para estadio I, el valor del CL50 fue de  $1,90 \times 10^{24}$  conidias/g entre el rango de  $1,01 \times 10^{19}$  y  $3,50 \times 10^{51}$  conidias/g y el valor del CL90 fue de  $2,30 \times 10^{31}$  conidias/g entre el rango de  $1,70 \times 10^{23}$  y  $1,90 \times 10^{73}$  conidias/g.

Para estadio II, el valor del CL50 fue de  $7,90 \times 10^{24}$  conidias/g entre el rango de  $2,30 \times 10^{19}$  y  $2,40 \times 10^{53}$  conidias/g y el valor del CL90 fue de  $9,10 \times 10^{31}$  conidias/g entre el rango de  $3,80 \times 10^{23}$  y  $1,30 \times 10^{75}$  conidias/g. Las concentraciones en estudio de *B. bassiana* para causar la muerte en las larvas de los primeros estadios de *S. frugiperda* tienden a ser muy altas tanto en la CL50 como en la CL90, por lo que se concluye que la cepa utilizada no es adecuada para el control de la plaga, no teniendo un efecto significativo. La cepa de *B. bassiana* BAZAM presento la CL50 a la concentración de  $7,00 \times 10^9$  conidias/g, debido a que la cepa es mas virulenta y patogénica <sup>(8)</sup>.

En el Cuadro 05, se observa que las concentraciones tienden a ser muy altas según los estadios para causar la muerte en las larvas, tanto en el CL50 como en el CL90, por lo que se concluye que la cepa utilizada por SENASA no es adecuada para el control de la plaga, no teniendo un efecto significativo, esto posiblemente se debe a que la cepa proviene de la plaga broca del café y no de *S. frugiperda* y por no presentar la capacidad patogénica a la plaga *S. frugiperda*. Estos resultados plantean la necesidad de utilizar concentraciones muy altas de hongos en campo para obtener niveles óptimos de control o cambio de cepa adecuada para su uso sobre esta plaga.

Según el Cuadro 06 y la Figura 03, se observa que en el estadio I; el 43,06 % causó la muerte a las larvas de *S. frugiperda* bajo una concentración de  $1,0 \times 10^{12}$  conidias/g, así mismo se aprecia que el 36,11 % de muerte en las larvas de insecto *S. frugiperda* bajo una concentración  $1,50 \times 10^{11}$  conidias/g el 27,78 % causo la muerte a las larvas del estadio I de *S. frugiperda* bajo una concentración de  $1,00 \times 10^{11}$  conidias/g, asimismo se aprecia que el 16,67 % de muerte en las larvas de los insectos plagas bajo una concentración  $1,00 \times 10^{10}$  conidias/g, mientras a concentraciones de  $1,00 \times 10^9$  conidias/g no causo la muerte de las larvas del estadio I. Las larvas vivas tuvieron un crecimiento normal y llegaron a ser a adultos.

En el estadio II se observa, la concentración de  $1,00 \times 10^{12}$  causo la muerte del 34,72 % de larvas de *S. frugiperda*, asimismo se aprecia que el 26,40 % de muerte en las larvas del insecto plaga bajo una concentración  $1,50 \times 10^{11}$  conidias/g, el 19,40 % causo la muerte a las larvas bajo una concentración de  $1,00 \times 10^{11}$  conidias/g, mientras que el 11,10 % de muerte en las larvas se aprecia bajo una concentración  $1,00 \times 10^{10}$  conidias/g, y la



concentración de  $1,00 \times 10^9$  conidias/g no causó muerte a las larvas del estadio II de *S. frugiperda*, las larvas vivas tuvieron un crecimiento normal y llegaron a ser adultos.

Los estudios realizados con hongos *B. bassiana* a la concentración de  $2,00 \times 10^8$  conidias/mL, obtuvo una gran variabilidad en la patogenicidad y virulencia de 79 cepas analizadas, se determinó que solo 18 cepas superaron el 80 % de mortalidad, 7 cepas menor de 20 % de mortalidad y 8 cepas presentaron 0 % de mortalidad <sup>(33)</sup>; A la concentración de  $1,00 \times 10^7$  conidias/mL encontró la mortalidad del 40 % <sup>(34)</sup>. Mientras otros estudios determinaron porcentajes de mortalidad de *S. frugiperda* con 4 cepas de *B. bassiana* del orden de 70 % en concentraciones elevadas de  $1,0 \times 10^9$  conidias/mL <sup>(35)</sup>.

En cuanto al estadio III, ninguna de las concentraciones estudiadas ocasionó la muerte de las larvas de *S. frugiperda*. Similarmente la concentración  $7,00 \times 10^9$  conidias/g estudiado no causó la muerte de larvas del estadio I, II y III. Igualmente no lograron buenos resultados con una cepa de *B. bassiana* la concentración de  $1,00 \times 10^9$  conidias/mL ó  $1,00 \times 10^{10}$  conidias/g <sup>(35)</sup>, debido a la baja virulencia de la cepa.

En el Cuadro 07, se observa que la cepa estudiada de *B. bassiana* requiere mucho tiempo para causar la muerte en las larvas de diferentes estadios en CL50 y en CL90. Para encontrar la muerte de CL50 se necesita entre los 15,9 a 17,3 días para los primeros estadios larvales, y para encontrar la muerte de CL90 se necesita entre 20,4 a 25,9 días para el segundo estadio a las concentraciones estudiadas.

Estos resultados plantean la necesidad de buscar aislamientos ó cepas más patogénicas para ser utilizados en el campo para obtener niveles óptimos de control.

En el cuadro 08, se observa que las diferentes concentraciones de la cepa *B. bassiana* CBLE-265  $1,00 \times 10^9$  conidias/g,  $1,00 \times 10^{10}$  conidias/g y  $1,00 \times 10^{11}$  conidias/g, no presentaron efectos sobre las ninfas de *Aphis craccivora*, debido a que la cepa no es adecuada para causar la muerte de esta plaga, por no presentar patogenicidad a la plaga. No hay reportes de investigación de *B. bassiana* sobre *A. craccivora*.

## V. CONCLUSIONES

- Para *Spodoptera frugiperda* estadio I, el valor del CL50 fue de  $1,90 \times 10^{24}$  conidias/g y el valor del CL90 fue de  $2,30 \times 10^{31}$  conidias/g, para estadio II, el valor del CL50 fue de  $7,90 \times 10^{24}$  conidias/g y el valor del CL90 fue de  $9,10 \times 10^{31}$  conidias/g. Para el estadio III, no se encontró letalidad con la cepa estudiada. Las concentraciones en estudio de *B. bassiana* para causar la muerte en las larvas de los primeros estadios de *S. frugiperda* parecen ser muy altas, dicha concentración y viabilidad debe ser estudiada en un estudios complementario al presentado
- La cepa estudiada de *Bauveria. bassiana* requiere mucho tiempo para causar la muerte en las larvas de diferentes estadios en CL50 y en CL90, por lo que se concluye que la cepa *B. bassiana* CBLE-265 no es patogénico para el control de la plaga *Spodoptera frugiperda*, en las concentraciones estudiadas en este estudio.
- Las diferentes concentraciones de la cepa *B. bassiana* CBLE-265  $1,00 \times 10^9$  conidias/g,  $1,00 \times 10^{10}$  conidias/g y  $1,00 \times 10^{11}$  conidias/g, no presentaron efectos sobre las ninfas de *Aphis craccivora*, debido a que la cepa no es patogénica para causar la muerte de esta plaga.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Estos resultados plantean la necesidad de buscar aislamientos ó cepas más patogénicas para ser utilizadas en el campo y así obtener niveles óptimos de control.
- Se recomienda seguir realizando estudios similares con nuevas cepas para el control de *Aphis craccivora*.

## VII. ANEXOS

### Anexo 01. Resultados del modelo PROBIT para el Tiempo de muerte promedio del estadio I y II.

#### SUPUESTOS:

#### 1.- Prueba de BONDAD de ajuste

#### Hipótesis:

H<sub>0</sub>: El modelo PROBIT es adecuado a los datos

H<sub>1</sub>: El modelo PROBIT no es adecuado a los datos

Nivel de significación  $\alpha = 0,05$

#### Estadístico de prueba

#### CHI-SQUARE TESTS

			Chi-Square	df	P
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	<b>1,00 x 10<sup>10</sup></b>	37,31	141	1,00
	conidias/g				
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	<b>1,00 x 10<sup>11</sup></b>	22,81	141	1,00
	conidias/g				
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	<b>1,50 x 10<sup>11</sup></b>	70,35	141	1,00
	conidias/g				
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	<b>1,00 x 10<sup>12</sup></b>	128,55	141	0,77
	conidias/g				

Referencia: Propia

**Regla de decisión:**

Si  $P < 0,05$  rechazar  $H_0$

Si  $P > 0,05$  aceptar  $H_0$

**Conclusión:**

Puesto que  $P\text{-valor} > 0,05$  Se acepta  $H_0$

Es decir el modelo PROBIT es adecuado a los datos.

**2.- Prueba de PARALELISMO****Hipótesis:**

**H<sub>0</sub>:** Las rectas son paralelas (las rectas que establecen los dos grupos reduce su confianza)

**H<sub>1</sub>:** Las rectas no son paralelas (las rectas que establecen los dos grupos no reduce su confianza)

**Nivel de Significancia:**  $\alpha=0.05$

**Estadístico de prueba****CHI-SQUARE TESTS**

<b>PROBIT</b>		<b>Chi-Square</b>	<b>df</b>	<b>Sig.</b>
Paralelismo Test	<b>1,00 x 10<sup>10</sup></b>	1,42	1	0,23
conidias/g				
Paralelismo Test	<b>1,00 x 10<sup>11</sup></b>	1,00E-08	1	1,00
conidias/g				
Paralelismo Test	<b>1,50 x 10<sup>11</sup></b>	1,00E-08	1	1,00
conidias/g				
Paralelismo Test	<b>1,00 x 10<sup>12</sup></b>	1,93	1	0,17
conidias/g				

Referencia: Propia

**Regla de decisión:**

Si  $P < 0,05$  rechazar  $H_0$

Si  $P > 0,05$  aceptar  $H_0$

**Conclusión:**

Puesto que  $P=0,00 < 0,05$  rechazar  $H_0$

Es decir las rectas no son paralelas (las rectas que establecen los dos grupos no reduce su confianza)

## Anexo 02. Resultados del modelo PROBIT para la determinación de CL50 y CL90

### SUPUESTOS:

#### 1.- Prueba de BONDAD de ajuste

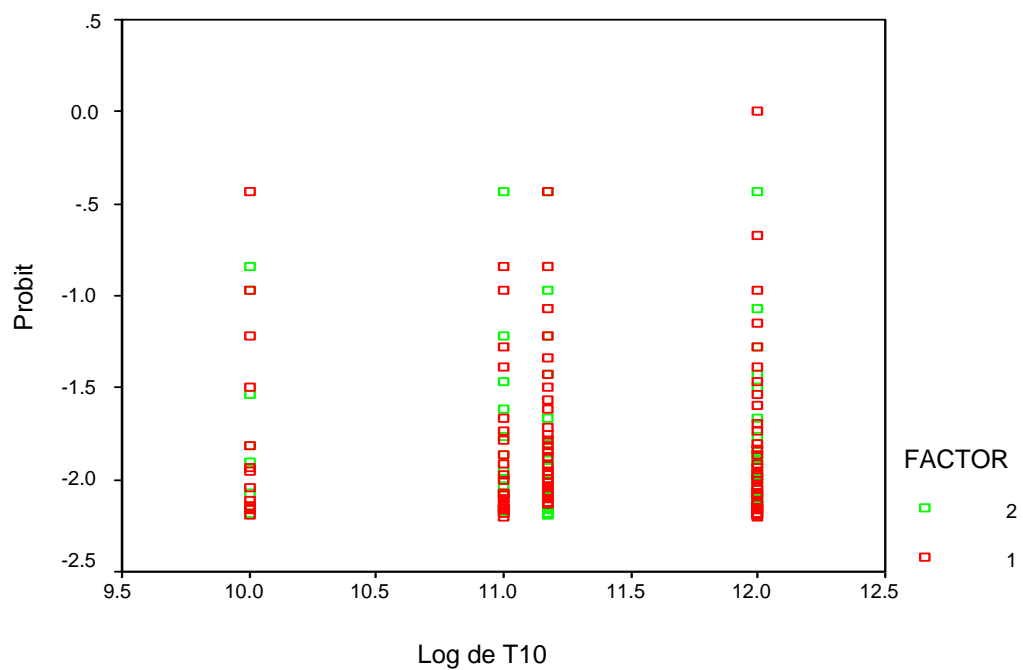
		Chi-Square	df	P
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	120.06	573	0,06
p-valor < 0,05 “Significativo”				

Los datos se ajustan a un modelo probit.

#### 2.- Prueba de PARALELISMO

		Chi-Square	df	Sig.
PROBIT	Paralelismo Test	1,00E-08	1	1,00
p-valor < 0,05 “Significativo”				

**Anexo 03. Transformación del modelo PROBIT**



**Anexo 04. Parámetros del modelo PROBIT TRANSFORMADO**

Parameter Estimates (PROBIT model:  $(\text{PROBIT}(p)) = \text{Intercept} + \text{BX}$ ):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
Concentración	0,18161	0,04315	4,20844

Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.	FACTOR
-4,41309	0,48607	-9,07909	1
-4,52245	0,48706	-9,28524	2



## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Soberanis, W.; Zapata, A.; Torres, E.; Tenerio, M.; Montes W. y Gómez H. Nueva tecnología de producción de hongos benéficos (Entomopatógenos y Antagonistas), Resumen, XIX Congreso Peruano de Fitopatología, 03-08 diciembre 2006, Cajamarca, Perú.
2. Alves, S. B. Fungos entomopatógenos. Control microbiano de insectos Ed. Manole. Sao Paulo, 1986.
3. Entomología hortícola – Pulgones. Acceso el 27 de Diciembre del 2008. Disponible en: [http://www.inia.cl/entomologia/p\\_tomate\\_alibre/pulgones2.htm](http://www.inia.cl/entomologia/p_tomate_alibre/pulgones2.htm)
4. Machado, L.; Rodrigues, L.; Guedes, L.; Stoffel, C. Fertility and longevity of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in corn genotypes. *Ciência rural*, 2004 mar-abr ; 34 (2): 345 – 50.
5. Monzón, A. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas*. CATIE, Costa Rica, 2001, 63: 95-103.
6. Jiménez, J. Determinación de la efectividad de *B. bassiana* , *M. anisopliae* y *P. megacephala* en el control de *Cosmopolites sordidus* en banano. Informe final, 1986-1990, Resultado 518.04.08. INISAV: 24.
7. Espinoza, A.; Cuba; I. Resultados del uso de *Bacillus thuringiensis* y *Beauveria bassiana* para control de plagas en la empresa de cultivos variados Taguasco, Sancti Spiritus. Mem. IV. Encuentro Nacional Científico – Técnico de Bioplaguicidas, INISAV, La Habana, 15-16 octubre 1996: 101.
8. Cocom, B. M. Tesis: Evaluación de la susceptibilidad de *Spodoptera frugiperda* a BAZAM® (*Beauveria bassiana*) en Zamorano, Nicaragua, 2006.
9. US EPA. *Beauveria bassiana* Strain GHA (128924) Technical Document. RE. [http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/tech\\_docs/tech\\_128924.htm](http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/tech_docs/tech_128924.htm), accessed: Sep 12, 2006.
10. Ruiz, H.J. Biosynthesis of beta-glucans in fungi. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1991; 60: 72-81.
11. Harold, F.M. In pursuit of the whole hypha. *Fungal Genet. Biol.*, 1999, 27: 128-133.
12. Jones, R.L. Role of field studies in assessing environmental behavior of herbicides. *Proc. Brighton crop protection conference. Weeds*. Vol. 3. Brighton, 1994, RU: 1275-1282.

13. Hajek, A.E. Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. *Adv. Microb. Ecol.*, 1997, 15: 193-249.
14. Deshpande, M.V. Mycopesticide production by fermentation: potential and challenges. *Crit. Rev. Microbiol.*, 1999, 25: 229-243.
15. Milner, J.R. Current status of *Metarhizium* as a mycoinsecticide in Australia. *Biocontrol News Inf.*, 2000, 20: 47-50.
16. Asaff, T.A., Reyes V.Y, López L.V.E, De la Torre M.M. Guerra entre insectos y microorganismos: una estrategia natural para el control de plagas. *Avance y Perspectiva*, México, 2002, 21: 291-295.
17. Barranco, F.E, Alatorre R.R, Gutiérrez R.M, Viniegra G.G, Saucedo C.G. Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. *Enz. Microb. Technol.*, 2002, 30: 910-915.
18. Barnes, S.E., Moore D. The effect of fatty, organic or phenolic acids on the germination of conidia of *Metarhizium flavoviride*. *Mycol. Res.*, 1997, 101: 662-666.
19. Jones, R.L. Role of field studies in assessing environmental behavior of herbicides. *Proc. Brighton crop protection conference. Weeds.*, 1994, Vol. 3. Brighton, RU.: 1275-1282.
20. Hegedus, D.; Khachatourians, G. The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. *Biotechnol. Adv.*, 1995, 13: 455-490.
21. Jones, R.L. Role of field studies in assessing environmental behavior of herbicides. *Proc. Brighton crop protection conference. Weeds.* Vol. 3. Brighton, 1994, RU.: 1275-1282.
22. Kershaw, M.J.; Talbot, N.J. Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. *Fungal Genet. Biol.*, 1998, 23: 18-33, 83.
23. James, R.R.; Buckner, J.S.; Freeman, T.P. Cuticular lipids and silverleaf whitefly stage affect conidial germination of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. *J. Invert. Pathol.*, 2003, 84: 67-74.
24. Riquelme, M.; Reynaga, P.C.G; Gires, G.; Bartnicki, G.S. (1998). What Determines Growth Direction in Fungal Hyphae? *Fungal Genet. Biol.*, 1998, 24: 101-109.
25. Gillespie, A.T.; Claydon, N. The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pesticide Sci.*, 1989, 27: 203-215.
26. St. Leger, R.J.; Roberts, D.W. Engineering improved mycoinsecticides. *Trends Biotechnol.*, 1997, 15: 83-87.

27. Bidochka, M.; Khachatourians, G. The implication of metabolic acids produced by *Beauveria bassiana* in pathogenesis of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *J. Invert. Pathol.*, 1991, 58: 106-117.
28. Logrieco, A.; Moretti, A.; Castella, G.; Kostecki, M.; Golinsky, P.; Ritieni, A.; Chelhowski, J. Beauvericin production by *Fusarium Species*. *Appl. Env. Microbiol.*, 1998, 64: 3084-3088.
29. Kanaoka, M.; Isogai, S.; Murakoshi, M.; Ichinoe, M.; Suzuki, A.; Tamura, S. Bassianolide, a new insecticidal cyclodepsipeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*. *Agric. Biol. Chem.*, 1978, 42: 629-635.
30. Finney DJ. *Probit Analysis*. Cambridge University Press 1971.
31. Piedra, F. Effect of different forage diets on the biology of *Spodoptera frugiperda* (Lep:Noctuidae). *Cuban. J. Agric. Sci. (English Ed.)*, 1974, .8: 99-103.
32. Faria, L.; Baros, R.; Oliveira, J. Patogenicidades de hongo entomopatógenos, *Beauveria bassiana* sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* utilizando métodos de inoculación. XII Congresso Brasileiro de Entomologia. Recife. Brasil, 1991, 290 p.
33. Lecuona, R.; Díaz, A. Técnicas empleadas para el control microbiano de insectos plaga. Buenos Aires, Argentina., 1996, 4 p.
34. Rodrigues, C y Pratissoli, D. Avaliacao de patogenicidade dos fungos entomógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre *Spodoptera frugiperda* (lagarta do cartucho de milho), "XII Congresso Brasileiro de Entomologia", Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil., 1989, p. 223.
35. Faria L. L. DE., Oliverira, J. V, DE y Barros , R. Patogenicidades do fungo Entomógeno *Beauveria bassiana*, sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda*, utilizando-se quatro isolados em tres concentracoes "XII Congresso Brasileiro de Entomologia", Recife, PE, Brazil., 1991, p. 290.